

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 24520121153138

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

瞬时感受器电位离子通道香草素受体亚家  
族 4 激动剂对肾脏缺血再灌再灌注损伤的保  
护作用及机制

The role of transient receptor potential vanilloid 4 on  
ischemia-reperfusion injury rats

王 宁

指导教师姓名: 张燕林

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于        年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

本文主要缩略语表(字母顺序排列)

英文简称	英文全称	中文全称
4a-PDD	4a-phorbol-12,13-didecanoate	4a-佛波醇-12, 13-二丁酸
AA	Arachidonic acid	花生四烯酸
ADPKD	Autosomal dominant polycystic kidney disease	常染色体显性遗传多囊肾
AKI	Acute kidney injury	急性肾损伤
ARF	Acute renal failure	急性肾衰竭
ATI	Acute tubular injury	急性肾小管损伤
ATN	Acute tubular necrosis	急性肾小管坏死
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
CAMP	Cyclic adenosine monophosphate	环腺苷酸
CKD	Chronic kidney disease	慢性肾病
Cre	Serum creatinine	肌酐
DG	Diacylglycerol	甘油二酯
DRG	Dorsal root ganglion	大鼠背根神经节
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor	内皮衍生性超极化因子
EETs	Epoxyeicosatrienoic acids	环氧-二十碳三烯酸
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	内皮型一氧化氮合酶
FSGS	focal segmental glomerular sclerosis	遗传性局灶节段硬化性肾病
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色法
HSH	hypomagnesemia associated with secondary hypocalciuria	低镁血症继发低钙血症
IRI	Ischemia reperfusion injury	缺血性再灌注损伤
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate	1, 4, 5, -三磷酸肌醇
IP <sub>3</sub> R	Inositol triphosphate receptor	1, 4, 5, -三磷酸肌醇受体
GSK	GSK1016790a	新型 TRPV4 激动剂

KCa	Ca-sensitive potassium channel	钙敏感性钾通道
LNA	Linolenic acid	亚麻酸
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome	多器官功能障碍综合症
NO	Nitric oxide	一氧化氮
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲盐水
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin	前列环素
PKA	Protein kinases A	蛋白激酶 A
PKC	Protein kinases C	蛋白激酶 C
PI	Phosphoinositide	磷酸肌醇
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>	膜磷脂磷脂酶 A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C	磷脂酶 C
PSAM	Periodic Acid-silver Methenamine	六胺银染色
PSS	Physiological saline solution	生理盐水
RR	Rudthenuim red	钨红
ROCC	Receptor-operated calcium channel	受体调控性钙通道
ROCE	Receptor-operated calcium entry	受体作动性钙流入
RyR	Ryanodine receptor	ryanodine 受体
SDS	Sodium lauryl sulfate	十二烷基硫酸钠
SOCC	Store-operated calcium channel	钙库调控性钙通道
SOCE	Store-operated calcium entry	钙库依赖性钙流入
TRPs	Transient receptor potential	瞬时感受器电位离子通道蛋白
TRPV4	Transient receptor potential vanilloid 4	瞬时感受器电位离子通道香草素受体亚家族 4
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

中文摘要.....	8
ABSTRACT.....	11
第一章 前 言 .....	13
第二章 实验材料和仪器 .....	23
2.1 实验材料和试剂 .....	23
2.2 仪器与耗材 .....	26
2.3 主要溶液配方 .....	28
第三章 实验方法 .....	31
3.1 概述.....	31
3.2 PASM 染色法及免疫组织化学法 .....	31
3.3 Real Time PCR 检测相关基因的表达.....	34
3.4 Western blot 方法.....	36
3.5 统计学分析 .....	38
第四章 实验结果 .....	39
4.1 实验动物相关指标变化 .....	39
4.2 各组大鼠血清肌酐、尿素氮水平比较 .....	39
4.3 大鼠肾脏病理结果 .....	42
4.4 TRPV4 和 eNOS 在肾脏组织的表达水平.....	44
第五章 讨论 .....	52
4.1 TRP 通道的研究进展.....	52
4.2 急性肾衰竭检测指标 .....	55
第六章 结 论 .....	60
第七章 创 新 点 .....	61

第八章 展 望 .....	62
---------------	----

参 考 文 献 .....	63
---------------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

## Table of Contents

<b>CHINESE ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>ENGLISH ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapter 2 Experiment material .....</b>	<b>23</b>
2.1 Solutions and materials .....	23
2.2 Equipments .....	26
2.3 Solution preparation .....	28
<b>Chapter 3 Methods .....</b>	<b>31</b>
3.1 Summary.....	31
3.2 PASM and immunocytochemistry .....	31
3.3 Detection of gene expression by Real Time PCR .....	34
3.4 Western blot.....	36
3.5 Statistical analysis .....	38
<b>Chapter Experiment results.....</b>	<b>39</b>
4.1 Surgury of rats .....	39
4.2 Levels of BUN and SCr in each group .....	39
4.3 Pathematology in rat renal.....	42
4.4 Expression of TRPV4 and eNOS in rat renal.....	44
<b>Chapter 5 Discussion .....</b>	<b>52</b>
4.1 TRP Channel and TRPV4 .....	52
4.2 Expression of TRPV4/eNOS/VEGF in acute renal injury .....	55
<b>Chapter 6 Conclusions.....</b>	<b>60</b>
<b>Chapter 7 Innovation points .....</b>	<b>61</b>



<b>Chapter 8 Lookings .....</b>	<b>62</b>
<b>References .....</b>	<b>63</b>

厦门大学博士论文摘要库

## 中文摘要

**目的** 肾血管损伤在急性肾损伤的发病机制中起重要作用。有研究报道, TRPV4 活性受细胞内外钙离子浓度的双重调节, 与肾血管内皮细胞损伤有关。本研究观察瞬时感受器电位离子通道香草素受体亚家族 4(Transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)激动剂对缺血再灌注肾损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。

**方法** 参照 Takada 等人的原位灌注法并加以改良, 建立了大鼠肾缺血再灌注损伤 45 分钟模型, 将实验动物随机分为 4 组: 假手术组、缺血再灌注组、治疗组、阻断组, 分别于 24h、72h 处死动物。治疗组大鼠给 TRPV4 激动剂、TRPV4 抑制剂, 缺血再灌注组给予适量生理盐水。检测其血清肌酐, 尿素氮水平, 组织病理, 同时行免疫组化、免疫电泳及实时定量 PCR, 检测肾组织中 TRPV4 及 eNOS 表达。

**结果** 1. 治疗组 GSK1016790A 可以改善缺血再灌注急性肾损伤的组织损伤, 与缺血再灌注组比较, 治疗组中血清肌酐及尿素氮水平显著降低( $228.4 \pm 32.62$  vs  $123.62 \pm 21.23$ ,  $35.65 \pm 13.9$  vs  $20.93 \pm 9.6$ ,  $p < 0.05$ ), 免疫组化及荧光定量 PCR 检测显示 TRPV4 及 eNOS 的表达明显升高 ( $p < 0.05$ )。 2. TRPV4 抑制剂钆红加重缺血再灌注急性肾损伤的组织损伤。血清肌酐及尿素氮水平显著升高 ( $p < 0.05$ )。

**结论** TRPV4 激动剂 GSK1016790A 可通过血管舒张改善缺血再灌注急性肾损伤。

**关键词:** TRPV4 通道; 缺血再灌注; 急性肾损伤

## ABSTRACT

**Research background:** TRPV4 channels are members of the vanilloid receptor subfamily and expressed in various tissues including kidney, endothelium, lung, spleen, heart, fat and brain. Northern blot analysis revealed that strong expression of TRPV4 present in the kidney. TRPV4 is one of the TRPVs, which mediates the influx of calcium across the plasma membrane. TRPV4 can be activated by pressure, heat, and pharmacological activators as GSK1016790A, as well as a range of putative endogenous mediators. When TRPV4 was activated it would promote the vascular relaxation. Endothelial and smooth muscle TRPV4 have been recognized to play an important role in the control of vascular tone. TRPV4 is participated in preserving vasorelaxation under hypoxia, which is critical to post-ischemic ‘no-reflow’ tissue regions. TRPV4 channels function as key endothelial ion channels for elementary calcium influx to control vascular function. Based on these aforementioned observations, TRPV4 plays a critical role in ischemic reperfusion acute kidney injury.

In this study, we investigated the effects of treatment with the TRPV4 agonist GSK1016790A and antagonist Ruthenium red (RR) on I/R induced AKI in rats. Our results support the view that activation of TRPV4 channels ameliorates I/R-induced AKI and inhibition of TRPV4 aggravated the outcome of AKI. Our finding provides a novel insight into the role of TRPV4 in AKI and novel therapeutic options.

**Objective:** TRPV4 are widely distributed in the kidney, suggesting that TRPV4-mediated action may participate in the regulation of renal function under pathophysiological conditions. It is unknown whether the activation of TRPV4 protects against ischemia/reperfusion (I/R) induced acute kidney injury (AKI) or not. We tested the role of TRPV4 in I/R-induced AKI by modulating these channels with GSK1016790A (TRPV4 agonist), Ruthenium red (RR, TRPV4 antagonist).

**Method:** Anesthetized rats were subjected to 45 minutes of renal ischemia and 24 hours of reperfusion. Rats were pretreated with GSK1016790A (30  $\mu\text{g/kg}$  body weight) or the Ruthenium red (10 mg/kg body weight). GSK1016790A ameliorated the outcome of AKI, as measured by serum creatinine levels, tubular damages; inhibition of TRPV4 was further deteriorated renal function and histology after AKI.

**Result:** The mean potassium current density of normal external solution perfusion group was  $92.81 \pm 4.10$  pA/pF, and after added diazoxide and glibenclamide to external solution, respectively, it increased to  $250.75 \pm 20.86$  pA/pF ( $P < 0.01$ ) and decreased to  $31.07 \pm 1.82$  pA/pF ( $P < 0.01$ ), respectively. When it contained 16.7 mmol/L glucose in external solution, the mean potassium current density attenuated to  $51.48 \pm 7.40$  pA/pF ( $P < 0.01$ ). Compared with normal control group, 2, 5 and 10  $\mu\text{mol/L}$  simvastatin treatment markedly enhanced the current density of ATP-sensitive potassium Channels, the mean amplitude reached to  $117.94 \pm 3.67$  pA/pF,  $153.91 \pm 12.38$  pA/pF,  $307.01 \pm 6.40$  pA/pF ( $P < 0.01$ ), respectively. As to L-type Calcium Channels, the current density was  $-21.03 \pm 0.55$  pA/pF and decreased to  $-1.08 \pm 0.36$  pA/pF ( $P < 0.01$ ) in glucose external solution group and glibenclamide intervened group, respectively. Compared with the former, the current density of 2, 5 and 10  $\mu\text{mol/L}$  simvastatin drug treatment groups decreased to  $-16.31 \pm 0.51$  pA/pF,  $-10.75 \pm 0.71$  pA/pF,  $-3.30 \pm 0.46$  pA/pF ( $P < 0.01$ ), respectively.

**Conclusion:** Activation of TRPV4 ameliorates I/R-induced AKI, inhibition of TRPV4 channels aggravate the outcome of AKI. Our results may have clinical implications for the treatment of I/R induced AKI.

**Keywords:** TRPV4; renal ischemia/reperfusion; ion channel

## 第一章 前言

肾功能在短时间内迅速恶化称为急性肾损伤(acute kidney injury, AKI), 此时通常血中尿素氮和肌酐值会有急速上升的现象。它是内科常见急症, 总体死亡率接近 50%, 导致近期和远期的不良后果, 进展为慢性肾病(Chronic kidney disease, CKD)。它具有重要的理论价值和临床实践意义, 涉及很多基本病理过程和临床情况, 如肾移植、肾脏手术、腹主动脉转流术、休克后微循环再通以及体外震波碎石等治疗的日益普及。在多器官功能障碍综合症(Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的病人中, 肾功能在其转归中起到了关键作用, 如果 MODS 病人合并有急性肾衰竭, 则预后较差, 由于其重要作用而引起人们高度重视, 虽然近年来伴随材料学和血液净化设备发展, 出现许多新型血液净化方式, 但是重症监护病房中合并急性肾损伤患者的病死率仍高达 50%。因此, 肾缺血再灌注损伤是近年来国内外临床和基础研究工作者普遍关注的一个重要课题, 其诊治和预防仍然是一个严峻课题。

### 1.1 急性肾损伤

急性肾衰竭的常见的病因有下列四点:

- 一. 肾前性急性肾衰竭, 主要包括: 体液不足、体液重新分布、心输出量减少及血管阻力增加等。
- 二. 肾性急性肾衰竭, 最常见原因为急性肾小管坏死, 其成因可分为缺血性与肾毒性两大类。
- 三. 肾后性急性肾衰竭, 阻塞性肾病变是重要原因。

由此我们可以得知, 急性肾损伤过程是内皮损伤、小管损伤、炎症反应与肾脏血流动力学变化等多因素相互作用的结果。其中, 肾血管损伤在急性肾损伤的发病机制中起重要作用, 血管内皮细胞功能障碍是肾小管上皮细胞损伤的重要原因。在急性肾损伤早期, 肾血管内皮细胞在遭受了肌动蛋白细胞骨架和复合连接体的破坏后, 发生肿胀甚至脱落, 导致管腔狭窄, 从而加重肾衰竭, 但是目前引起肾血管内皮细胞功能障碍的分子机制还不是很清楚。同时, 微血管内皮细胞肿胀, 还可以造成微血管壁通透性升高, 如伴有输液过多, 则组织间水分潴留, 使毛细血管到实质器官细胞内线粒体距离增加, 氧弥散障碍, 造成氧分压下降。

当线粒体内  $PO_2$  降低，线粒体氧化磷酸化功能障碍，三磷酸腺苷（Adenosine triphosphate, ATP）减少，环腺苷酸（Cyclic adenosine monophosphate, CAMP）酶受抑制，又影响了 CAMP 的生成，从而造成细胞功能障碍。通过动物模型来理解 AKI 的病因非常有限，因此研究主要聚焦于各种不同类型的肾脏细胞。由于 AKI 是一个复杂的疾病单元，会影响到肾小管上皮细胞、内皮细胞和炎症细胞，因此理解 AKI 的病理生理及其后果需要分析这些不同类型细胞在疾病起源和进展过程中的相对贡献。有研究发现，血流剪切力作用于血管内皮细胞，可参与血管张力的调节。另有研究发现，细胞内钙库耗竭可显著增加血流剪切力引起的内皮细胞钙内流和血管舒张，从而影响急性肾损伤的发生发展，但其机制尚未明确。

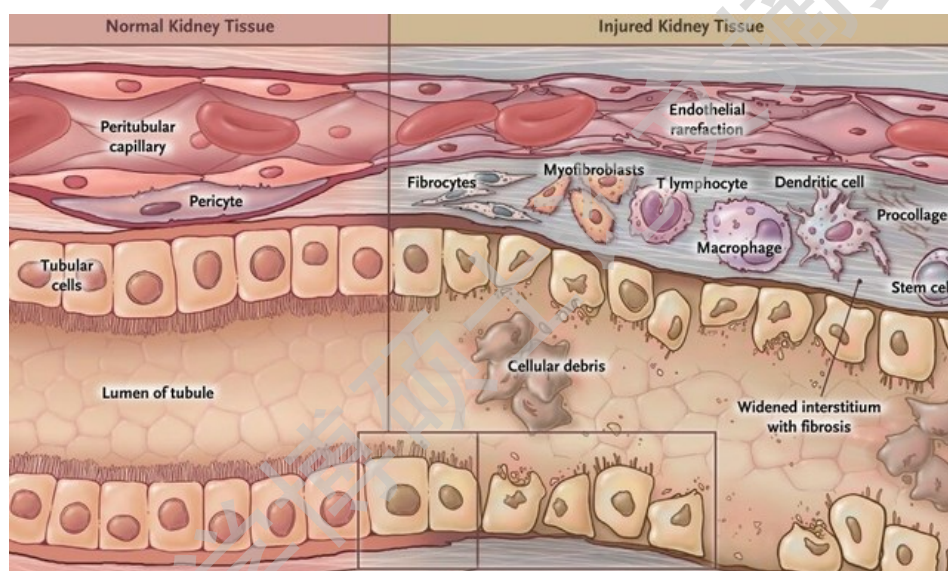


图 1 急性肾损伤的病理生理学特征

Figure1 feature of acute kidney injury

## 1.2 TRP 家族与肾脏

### 1.2.1 TRP 家族及其激活机制

瞬时感受器电位离子通道家族（TRPs）是逐渐成为了广受关注的离子通道蛋白，其通过的离子特性为非选择性的阳离子，广泛存在于各种细胞，尤其是血管的细胞膜或细胞器膜上。1990 年在果蝇的光感受器异常变异株基因上发现了 TRP 基因，从此逐渐被许多科学家熟知，目前已经得知瞬时感受器电位离子通道家族编码的蛋白质广泛分布于各种哺乳动物细胞之中，发挥重要作用。以下七个亚家族共同组成了瞬时感受器电位离子通道蛋白家族，分别是：TRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPP、TRPA、TRPN。七种瞬时感受器电

位离子通道类似的离子结构：具有位于胞内的 N 端和 C 末端的六次跨膜结构（S1-S6），S5 和 S6 之间的疏水片段构成了其离子通透区，含有锚蛋白（Ankyrin）样重复序列位于其 N 末端，C 末端具有高度保守的瞬时感受器电位离子通道结构域。2-4 个保守的锚蛋白样重复序列位于其氨基端，可能与细胞膜锚定有关。不同的 TRP 家族成员其羧基端变化比较大，有研究表明这种变化与瞬时感受器电位离子通道的自身调节有很大关系。尽管紧邻第六跨膜节段的感受器电位离子通道蛋白结构域和多聚脯氨酸序列无明显变化，但是在其下游，瞬时感受器电位离子通道家族成员具有独特的调节位点，如钙调蛋白 1, 4, 5, -三磷酸肌醇受体的结合位点、结合序列等。TRP 家族与其他离子通道家族显著区别在于其他家族各成员之间的同源性较低，并且可被多种介质和配体激活或敏化，因为这些离子结构特点，造成 TRPs 成员之间有相类似的生理学功能。TRPV 与 TRPs 家族其他成员不同之处在于它缺少 C 末端多聚脯氨酸序列。

通过神经递质和生长因子等分别作用于 G 蛋白偶联受体（G Protein-Coupled Receptors, GPCRs）和酪氨酸激酶受体（receptor tyrosine kinase, RTKs）激活瞬时感受器电位离子通道。刺激物与 G 蛋白偶联受体结合后发生构象变化，激活磷脂酰肌醇信号通路，从而导致 1, 4, 5, -三磷酸肌醇和二酰基甘油两个第二信使产生。第二信使 1, 4, 5, -三磷酸肌醇在内质网内与配体门钙通道结合而起作用，开启钙通道，使细胞内钙浓度升高，引起钙库钙释放和钙库清空，同时激活了依赖钙离子的蛋白-比如 TRP 离子家族。二酰基甘油（DG）结合于质膜，活化与质膜结合的蛋白激酶 C 产生一系列生理变化-如血管收缩等，DG 本身也被代谢为花生四烯酸（Arachidonic acid, AA）和亚麻酸（Linolenic acid, LNA）等，从而影响钙库释放。信号分子刺激酪氨酸激酶受体，使尾部酪氨酸残基磷酸化，形成信号复合物后产生细胞的综合性应答。研究表明 G 蛋白偶联受体和酪氨酸激酶受体这两个信号支路都可以激活瞬时感受器电位离子通道。钙库清空激活瞬时感受器电位离子通道，导致了 SOCE 类型的钙流入，负载的通道 SOCC；而瞬时感受器电位离子通道通道被激活 DAG 及其脂质代谢物所导致了 ROCE 类型的钙流入，负载的通道为 ROCC。

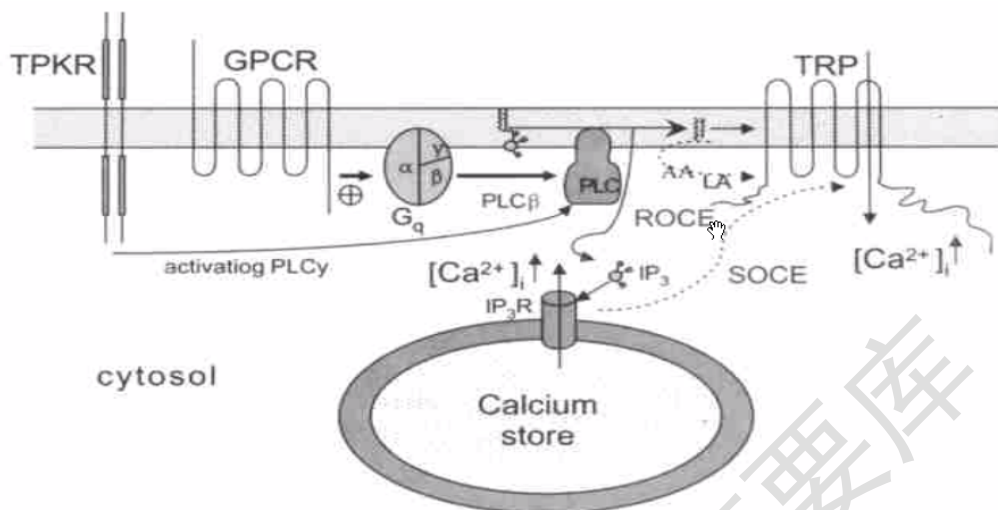


图2 激活 TRP 的信号转导通路

Figure2 translate signal channel of TRP activation

作为一种多功能和表达广泛的离子通道，瞬时感受器电位离子通道家族与肾脏的诸多生理功能直接相关，比如肾小管的离子转运、肾脏的微循环等，所以瞬时感受器电位离子通道家族的结构功能异常会导致多种肾脏疾病，如 HSH, FSGS, ADPKD 等遗传肾脏病，但是瞬时感受器电位离子通道的对肾脏的致病机制还未完全阐明，仍然有许多和肾脏相关的瞬时感受器电位离子通道还没有被发现，这一广阔领域有待我们进一步研究。

### 1.2.2 TRPV5 和 TRPV6

约 730 个氨基酸组成了 TRPV5 与 TRPV6 蛋白，相关的基因位于染色体 7q35，有 15 外显子，TRPV5 和 TRPV6 对于内向整流钙离子通道选择性最高，TRPV5 和 TRPV6 转染 HEK293 细胞，较高的细胞内钙离子浓度可以激活单元电流和输出电流，这两种离子通道，孔面积的不同和这些残基中的负电荷影响它的钙选择性，测定的 TRPV5 和 TRPV6 孔半径约为 5.4 Å，以取代孔半径的 TRPV6 结构。4 个天冬氨酸环导致了 TRPV5 和 TRPV6 的钙选择性渗透性程度。研究不同物种的多种生物学属性，对多种不同的生物种属的研究表明：DCT2 和 CNT 是跨膜钙离子转运的主要部位。最近研究发现 TRPV5 敲除小鼠的尿钙排泄明显增多，其血钙水平正常的情况下，1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 在细胞内的水平明显升高，但是从肾小管到近端小管最末端为止的重吸收钙水平与 Wild-Type 小鼠相比并未发生改变，而在 DCT 及 CNT 中钙排泄明显增多。小鼠敲除了瞬时感受器电



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.